



咀嚼筋における持続的筋活動、浮腫性変化および痛み の関連に関する研究

著者	佐々城 真
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15743号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58670

博 士 論 文

咀嚼筋における持続的筋活動、浮腫性変化および
痛みの関連に関する研究

佐々城 真

平成 2 5 年度提出
東北大学

咀嚼筋における持続的筋活動、浮腫性変化および
痛みの関連に関する研究

佐々城 真

東北大学大学院歯学研究科
口腔病態外科学講座
口腔診断学分野

緒言

歯科臨床において、咀嚼筋の痛みを訴えて来院する患者は多く、その痛みは開口障害や咀嚼障害を引き起こし、患者の **Quality of Life (QOL)** を著しく低下させている。しかしながら、咀嚼筋における痛みのメカニズムについては不明な点が多く、また、臨床における咀嚼筋の痛みに対する診断は問診、触診などにより患者の主観に頼っているのが現状であり客観的な診断法は確立されていない。近年、咬筋の痛みに対して、超音波装置や MR 装置を用いて画像評価した報告が散見され、いずれの報告においても咬筋に痛みのある群では、健常人に比べて、筋の浮腫性変化がみられると述べられている^(1,2)。当教室では既に、咬筋に対する痛み刺激は咬筋内の血漿漏出を引き起こし、浮腫性変化を引き起こすことを明らかとし、咬筋の痛みには、咬筋内の血漿漏出による浮腫性変化が関与している可能性について報告した⁽³⁾。しかしながら、咬筋の持続的筋活動が血漿漏出を引き起すか否か、また、咬筋の持続的筋活動による痛みと血漿漏出との関係については明らかではない。そこで本研究では、咬筋の持続的筋活動、浮腫性変化および痛みの関連メカニズムについて明らかにすることを目的とし、実験を行うこととした。

材料及び方法

1. 実験動物

BALB/c 雄 6 週齢マウス 56 匹（体重 25～35g）に対し、尾静脈よりエバンスブルーを全身に投与し実験を行った。

これまでに Ayada ら⁽⁴⁾は、マウスがプラスチック板を自発的に咬む装置を考案し、その“咀嚼様運動”の際のプラスチック板の減少量を咀嚼運動量として算出し、咬筋の持続的筋活動量の指標とする方法として報告している。その方法に準じて、実験群ではマウスを

細い筒に入れ、プラスチック板を2時間咬ませ、持続的筋活動マウスモデルとした。対照群ではプラスチック板を咬めない状態に尻尾をテープで固定し2時間放置した。

なお、本研究は東北大学医学部動物実験倫理委員会により承認が得られたプロトコールに基づいて管理および実験を行った。

2.咬筋における血漿漏出の組織学的評価

実験群(n=6)および対照群(n=6)ともに、尾静脈から2%のエバンスブルー0.1mlを全身に投与した。実験群には2時間の咀嚼運動を行わせ、対照群は筒の中で2時間放置した後、ペントバルビタールナトリウム 50mg/kg の腹腔内注射による全身麻酔を行った。その後、心臓より生理食塩水を灌流し、血管内エバンスブルーを洗い流した後、左右咬筋を摘出しヘキササンで凍結標本とし、 -80°C で保存した。標本は咬合平面と平行に、下顎下縁から1mm上方部、中央部、頬骨弓から1mm下方部の3つの部位で25 μm の厚さにクライオスタットを用いて切り出し、凍結切片標本を作製した。標本の観察は、Nakamura ら⁽⁵⁾の報告に準じて蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000、KEYENCE 社製) を用いて、蛍光フィルタは OP-66836 BZ フィルタ GFP-BP を使用し、露光時間は 1/2s の条件で行った。

3.咬筋における血漿漏出の定量的評価

実験群(n=11)および対照群(n=11)ともに、尾静脈から5%のエバンスブルー0.1mlを全身に投与した。実験群には2時間の咀嚼運動を行わせ、対照群は筒の中で2時間放置した後、ペントバルビタールナトリウム 50mg/kg の腹腔内注射による全身麻酔を行った。その後、心臓より生理食塩水を灌流し、血管内エバンスブルーを洗い流した後、左右咬筋を摘出した。摘出した咬筋は、Humphrey の報告⁽⁶⁾を参考にしてアセトン・硫化ナトリウム抽出液 1ml に24時間浸漬した。抽出液の吸光度を吸光光度計(MultiscanFc, Thermo Scientific, Japan; filter, 620nm)にて測定し、咬筋 1g あたりのエバンスブルー量を算出し

た。また、灌流効果の違いによる個体差を除外するために、参照として両側棘下筋（肩甲骨から上腕部にかけて存在する筋）を摘出し、棘下筋 1 g あたりのエバンスブルー量に対する咬筋 1 g あたりのエバンスブルー量を相対値として算出した（咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比）。

なお、実験群に対しては、咀嚼運動前後のプラスチック板の重量を測定し、プラスチック板の減少量と咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比との関係についても評価した。

4.局所麻酔による血漿漏出の効果

痛みと血漿漏出との関連を調べるために、局所麻酔により痛みを除去することにより血漿漏出が抑制されるかどうかを調べた。実験群(n=11)に対して右側咬筋には局所麻酔剤 (Mepivacaine Hydrochloride; Scandonest cartridge 3%, Nippon Shika Yakuhin Co., Ltd, Shimonoseki, Japan)を 0.04ml 注入し、左側咬筋には生理食塩水を同量注入した。注入後、尾静脈から 5 %エバンスブルー0.1ml を全身に投与し、2 時間咀嚼運動させ、咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比を測定した。また、対照群(n=11)に対しても、実験群と同様に右側咬筋に局所麻酔剤、左側咬筋に生理食塩水を注入後、プラスチック板を咬めない状態で 2 時間放置し、咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比を測定した。

5.統計処理

統計処理は、統計ソフト（JMP 10, SAS Institute Japan, 東京）を用いて行った。実験群と対照群の比較は、non paired-t test を用いて行った。プラスチック板の減少量と咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比との関係は Spearman の順位相関係数を用いた。左右咬筋の比較は paired-t test を用いて行った。危険率 0.05 以下を有意とした。

結果

1.咬筋における血漿漏出の視覚的評価

灌流後の咬筋のマクロ写真を図 1 に示す。2 時間の咀嚼運動により、実験群の咬筋（図 1-A）は対照群の咬筋（図 1-B）と比較してエバンスブルーによる着色が強く観察された。

図 2 に蛍光顕微鏡下で観察した咬筋の切片像を示す。実験群では、下顎下縁から 1 mm 上方部（図 2-A）、中央部（図 2-B）、頬骨弓から 1 mm 下方部（図 2-C）のいずれの部位においても、咬筋全体にエバンスブルーの蛍光発色が観察されたが、対照群（図 2-D,E,F）では蛍光発色はほとんど観察されなかった。

2.咬筋における血漿漏出の定量的評価

咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比の値は、実験群が対照群の約 2 倍の値を示し、両群の間には統計学的有意差が認められた（図 3 : $p<0.01$ ）。

図 4 にプラスチック板の減少量と咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比との関係性を示す。縦軸に咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比、横軸にプラスチック板の減少量を示す。プラスチック板の減少量が多いほど咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比は大きくなっており、両者の間には高い相関がみられた（順位相関関数 : 0.89、 $p<0.001$ ）。

3.局所麻酔による血漿漏出の変化

図 5-A は、実験群に対して右側咬筋に浸潤麻酔（麻酔側）、左側咬筋に生理食塩水を注入し（非麻酔側）、咀嚼運動を行わせたときの咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比の値を示す。いずれのマウスにおいても麻酔側の値は、非麻酔側の値と比較して小さい値となり、麻酔側と非麻酔側の間には統計学的有意差がみられた（ $p<0.01$ ）。

一方、対照群では麻酔側と非麻酔側の間には統計学的有意差はみられなかった（図 5-B、

$p=0.96$)。

図 5-C に、麻酔側の値を非麻酔側の値で割った値を示す。実験群は 0.73 ± 0.14 、対照群は 0.99 ± 0.06 となり、両群の間には統計学的有意差がみられた ($p < 0.001$)。

考察

エバンスブルーは、血中アルブミンと高い親和性を持つ色素であり、炎症などにより血管透過性が亢進するとアルブミンと結合したエバンスブルー色素は、血管外に漏出し周囲組織に沈着する。この現象を用いたエバンスブルー法は、皮膚科領域において血管透過性亢進による血漿漏出を視覚的に評価できる方法として広く用いられている^(6,7)。本実験では、咀嚼運動後のマウスの咬筋内にエバンスブルーの組織沈着量の増加がみられ、この現象は、咀嚼運動によって咬筋内に血漿漏出が惹起され、浮腫性変化が引き起こされたことによるものと考えられる。ヒトの咀嚼運動後の咬筋の変化として、Bakke ら⁽⁸⁾は、咀嚼運動後の咬筋の厚さについて超音波装置を用いて測定したところ、咀嚼運動後の咬筋は厚さが増しており、咬筋に浮腫が起きている可能性があると考えしている。また、Ariji ら⁽⁹⁾は、低レベルの持続的な咬みしめを行ったあとの健常者の咬筋について MRI を用いて観察すると、咬筋の厚さが有意に増加しており、筋肉内の含水量が増して浮腫性変化が起きていると結論づけている。しかしながら、浮腫性変化の原因である血漿漏出について、咬筋の持続的筋活動という観点から明確に示した研究はこれまでなく、本研究が最初の報告である。

Ayada ら⁽⁴⁾ は、自発的にプラスチック板を咬む咀嚼運動によって、ヒスタミン生合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素の活性がマウス咬筋内において上昇していると報告しており、持続的筋活動によりマウスの咬筋に疲労が惹起される可能性を示唆している。ヒスタミンは、炎症反応によって肥満細胞、血管系細胞から遊離されることにより、血管拡張、血管透過性亢進作用を示すことが知られており、Ayada ら⁽⁴⁾の報告から、プラスチック板を咬む

咀嚼運動によって浮腫性変化が起きている可能性が裏付けられていると思われる。本研究ではさらに、プラスチック板を咬んだ重量が多いほど咬筋内にエバンスブルーの組織沈着量が増加することを示し、咬筋の持続的筋活動の量と血漿漏出の程度についても相関関係があることを明らかにした。

筋の痛みに関しては、その発生メカニズムや病態生理など、いまだ不明な点が多く、何種類もの異なったタイプの筋痛があるとされている。特に過剰な負荷による筋緊張の増大は、筋肉局所の血流障害を引き起こし、酸素不足になり、発痛物質の生成が促進される⁽¹⁰⁾。川喜多⁽¹¹⁾は、虚血状態で筋の収縮を繰り返すと、ATP の補給を解糖系に依存するため、乳酸が発生し局所的なアシドーシスとなり、それに伴い発痛物質であるブラジキニンが産生され直接侵害受容器を刺激すると報告している。ブラジキニンは、血漿カリクレイン・キニン系の活性化により血漿中に遊離され、発痛、血管透過性亢進、血管拡張などの炎症に関連した生体反応を誘導することで知られている。また、ブラジキニン自身はプロスタグランジン E₂ の産生を促し侵害受容器の興奮性を高め、ATP の欠乏は乳酸産生とは無関係にアデノシンを産生し、それも痛みの原因になるとも報告している。一方、痛みと浮腫性変化の関連について、感覚神経は、感覚情報の中枢投射という第一義的な機能の他に、神経の枝分かれを介して末梢方向にも情報を伝達し（逆伝導）、神経終末よりサブスタンス P などの神経伝達物質を放出し、支配領域の血管透過性亢進や血管拡張が起こることが知られている（神経原性炎症）⁽¹²⁾。すなわち、痛みは血管透過性を亢進し、周囲組織の血漿漏出を引き起こす。この血漿漏出により組織は浮腫性変化をきたし、内圧を亢進し更なる痛みを誘発する。この悪循環により神経原性炎症は増悪すると考えられている。このような現象が口腔領域で起こるか否かについては、既に Sasano ら^(13,14)により、歯および歯周組織でも生じることが証明されている。三叉神経領域の血漿漏出をエバンスブルー法にて評価した研究としては、Janscó-Gábor ら⁽¹⁵⁾の報告があり、ラット三叉神経節への電気刺激により、顔面領域に広く血漿漏出がみられたと報告されている。この血漿漏出のメカニズムに

については、感覚神経終末より放出されるサブスタンス P (SP) やニューロキニン A、また、SP によって刺激を受けた肥満細胞や白血球より放出されるヒスタミン、セロトニン、サイトカイン、ロイコトリエンが関与しているとされている⁽¹²⁾。放出されたヒスタミン、セロトニンは末梢で発痛作用があることが知られ、炎症性サイトカインには炎症の惹起・持続作用、痛覚過敏の発生、プロスタグランジン類の産生促進作用などがあることが知られている。

咬筋に痛みのある患者を実際に観察した研究として先に述べたように、Ariji ら⁽¹¹⁾は、超音波装置を用いた研究で、咬筋に痛みのある患者の咬筋は健常者と比較して厚みが増しており浮腫性変化が起きていると報告している。また、厚みが増している咬筋は含水量が多くなっており、低エコーであるとも述べている。さらに Nagayama ら⁽¹²⁾は、MRI を用いた実験で、咬筋の筋痛患者では咬筋内に自由水が増加しており、筋肉内に浮腫性変化が起きていると報告している。また、Nikkuni ら⁽¹⁶⁾は、片側性に咬筋に痛みのある TMD 患者の咬筋について MRI を用いて観察した結果、痛みのある側の咬筋は痛みのない側と比較して T2 値が高くなっていると報告している。以上の報告は、咬筋の浮腫性変化と痛みとの相関を強く示唆している。Iikubo ら⁽³⁾は、痛み刺激として capsaicin をラット咬筋に注入したところ、血漿漏出による咬筋の厚みの増加がみられ、浸潤麻酔を行うことにより capsaicin 注入による血漿漏出が抑制されたと報告しており、痛みによる感覚神経由来の神経原性炎症が浮腫性変化に関与することを明らかにしている。本実験では、直接的に痛みを定量することは出来なかったが、局所麻酔による血漿漏出の変化について調べたところ、咀嚼を行わせた実験群では、麻酔側咬筋のエバンスブルーの組織沈着量は非麻酔側と比較して有意に減少しており、咀嚼運動を行わせた対照群では、麻酔側と非麻酔側のエバンスブルーの沈着量に有意差がなかったことが示された。この結果およびこれまでの報告を総合すると、咬筋の持続的筋活動により生じた痛みは咬筋内の浮腫性変化を惹起すると考えてよいと思われる。痛みによって惹起された浮腫は、感覚神経を圧迫することにより更なる

血漿漏出を引き起こし、痛みを増悪させることは十分に考えられる。したがって、咬筋の痛みを訴える患者に対しては、速やかに痛みを除去することが臨床において重要と思われる。今後は、痛みと持続的筋活動の関連をさらに追及するために、咀嚼運動を行ったマウス咬筋を用いて、各種発痛物質の定量化を行っていく必要があると考えている。

結論

持続的筋活動マウスモデルを用いた実験から、咬筋の持続的筋活動は、咬筋に血漿漏出・浮腫性変化を引き起こすことが示され、この変化に痛みが双方向的に関連している可能性が示唆された。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇篤な御指導と御高閲を賜りました東北大学大学院歯学研究科 口腔病態外科学講座 口腔診断学分野 笹野高嗣教授に深謝致します。また、本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御助言を頂きました飯久保正弘講師に心より感謝致します。さらに本研究に御支援くださった口腔診断学教室の先生方に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Ariji Y, Sakuma S, Sasaki J, Izumi M, Kurita K, Ogi N: Ultrasonographic features of the masseter muscle in female patients with temporomandibular disorder associated with myofascial pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* . 2004; 98: 337-341.
- 2) Nagayama K, Suenaga S, Nagata J, Takada H, Majima HJ, Miyawaki S: Clinical significance of magnetization transfer contrast imaging for edematous changes in masticatory muscle. *J Comput Assist Tomogr*. 2010; 34: 233-241.
- 3) 飯久保正弘、山村宗正、李 麗、森 士朗、小嶋郁穂、佐藤しづ子、庄司憲明、阪本真弥、笹野高嗣：咬筋における痛みと浮腫性変化に関する研究；日本機械学会 2010 年次大会講演論文集. 2010; 6: 165-166.
- 4) Ayada K, Tadano T, Endo Y: Gnawing behavior of a mouse in a narrow cylinder: A simple system for the study of muscle activity, fatigue, and stress. *Physiol Behav* 2002; 77: 161-166.
- 5) Nakamura T, Saito R, Sugiyama S, Sonoda Y, Kumabe T, Tominaga T: Local convection-enhanced delivery of chemotherapeutic agent transiently opens blood-brain barrier and improves efficacy of systemic chemotherapy in intracranial xenograft tumor model. *Cancer Lett*. 2011; 310: 77-83.
- 6) Humphrey DM: Measurement of cutaneous microvascular exudates using Evans blue. *Biotech Histochem*. 1993; 68: 342-349.
- 7) Jancsó-Gábor A: A simple method for measuring the amount of azoan blue exuded into the skin in response to inflammatory stimulus. *J Pharm Pharmacol*. 1967; 19: 486-487.
- 8) Bakke M, Thomsen CE, Vilmann A, Soneda K, Farella M, Møller E: Ultrasonographic assessment of the swelling of the human masseter muscle after

- static and dynamic activity. Arch Oral Biol. 1996; 41: 133-140.
- 9) Ariji Y, Taguchi A, Sakuma S, Miki M, Asawa T, Uchida K, et al.: Magnetic resonance T2-weighted IDEAL water imaging for assessing changes in masseter muscles caused by low-level static contraction. Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109: 908-916.
- 10) 福田謙一、笠原正貴、一戸達也、金子譲：咀嚼筋痛・顎関節痛の発生メカニズムとその対応. 歯界展望. 2003; 101: 783-789.
- 11) 川喜田健司：筋痛のメカニズム. 神経進歩. 1998; 42: 475-482.
- 12) Holzer P: Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. Gen Pharmacol. 1998; 30: 5-11.
- 13) Sasano T, Kuriwada S, Shoji N, Sanjo D, Izumi H, Karita K: Axon reflex vasodilatation in cat dental pulp elicited by noxious stimulation of the gingival. J Dent Res. 1994; 73: 1797-1802.
- 14) Sasano T, Sato-Kuriwada S, Iikubo M, Shoji N: Neural regulation of pulpal blood flow and pulp diagnosis. Dentistry in Japan. 2006; 42: 100-106.
- 15) Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J: Neurogenic inflammatory responses. J Dent Res. 1972; 51: 264-269.
- 16) Nikkuni Y, Nishiyama H, Hayashi T: Clinical significance of T2 mapping MRI for the evaluation of masseter muscle pain in patients with temporomandibular joint disorders. Oral Radiol. 2013; 29: 50-55.

図・表の説明

図 1 灌流後の咬筋のマクロ写真

A : 実験群 B : 対照群

実験群の咬筋 (A) は対照群の咬筋 (B) と比較してエバンスブルーによる着色が強く観察された。

図 2 灌流後の咬筋の蛍光顕微鏡像

A : 下顎下縁から 1 mm 上方(実験群) B : 中央付近(実験群) C : 頬骨弓から 1 mm 下方(実験群)
D : 下顎下縁から 1 mm 上方(対照群) E : 中央付近(対照群) F : 頬骨弓から 1 mm 下方(対照群)

いずれの部位においても、実験群は対照群と比較して全体的に蛍光発色がみられ、特に表層筋膜に強くみられた。

図 3 咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比

棘下筋 1 g あたりのエバンスブルー量に対する咬筋 1 g あたりのエバンスブルー量 (咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比) の平均値は、実験群のほうが対照群に比較して有意に高い値となった ($p<0.01$)。

図 4 プラスチック板の減少量とエバンスブルー量との関係

プラスチック板の減少量が多いほど咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比の値が高くなっており、両者には高い相関がみられた (順位相関関数 : 0.89、 $p<0.001$)。

図 5 浸潤麻酔がエバンスブルー量に与える影響

A : 実験群 B : 対照群 C : 麻酔側のエバンスブルー量／非麻酔側のエバンスブルー量

実験群(A)では、麻酔側の咬筋は非麻酔側と比較してエバンスブルー量が有意に減少していた ($p<0.01$)。咀嚼運動を行なわなかった対照群(B)では左右に差がみられなかった。麻酔側のエバンスブルー量の値を非麻酔側のエバンスブルー量の値で割ったときの平均値では、実験群のほうが対照群と比較してエバンスブルー量が有意に低い値となった ($p<0.001$)。

図1 灌流後の咬筋のマクロ写真

A: 実験群 B: 対照群

A



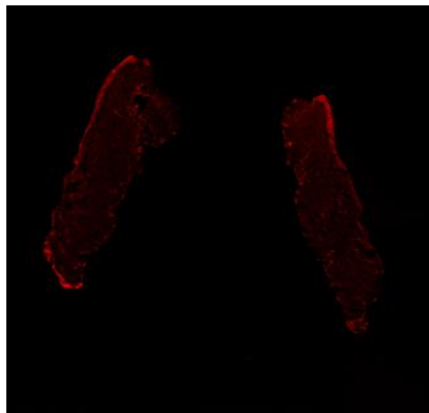
B



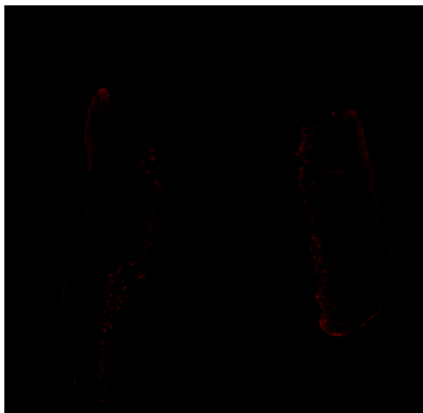
Figure 2 灌流後の咬筋の蛍光顕微鏡像

- A: 下顎下縁から1mm上方(実験群)
- B: 中央付近(実験群)
- C: 頬骨弓から約1mm下方(実験群)
- D: 下顎下縁から1mm上方(対照群)
- E: 中央付近(対照群)
- F: 頬骨弓から約1mm下方(対照群)

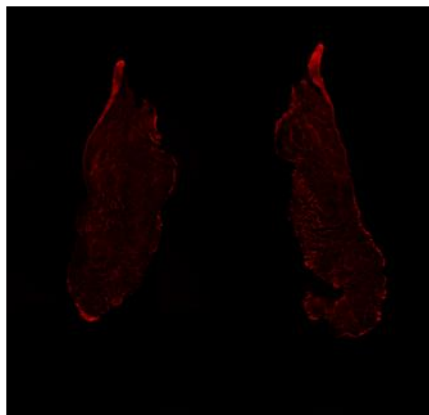
A



D



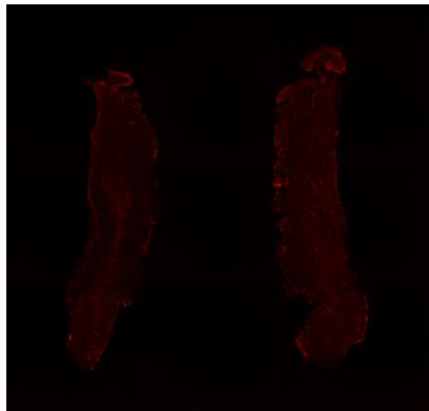
B



E



C



F

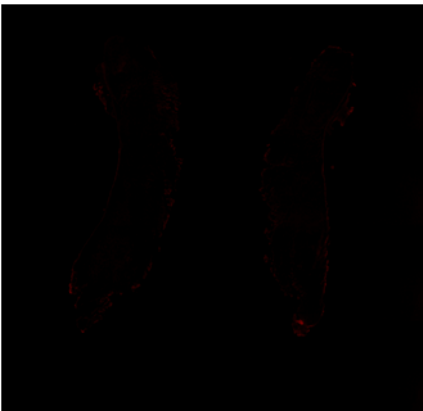


図3 咬筋／棘下筋のエバンスブルー量比

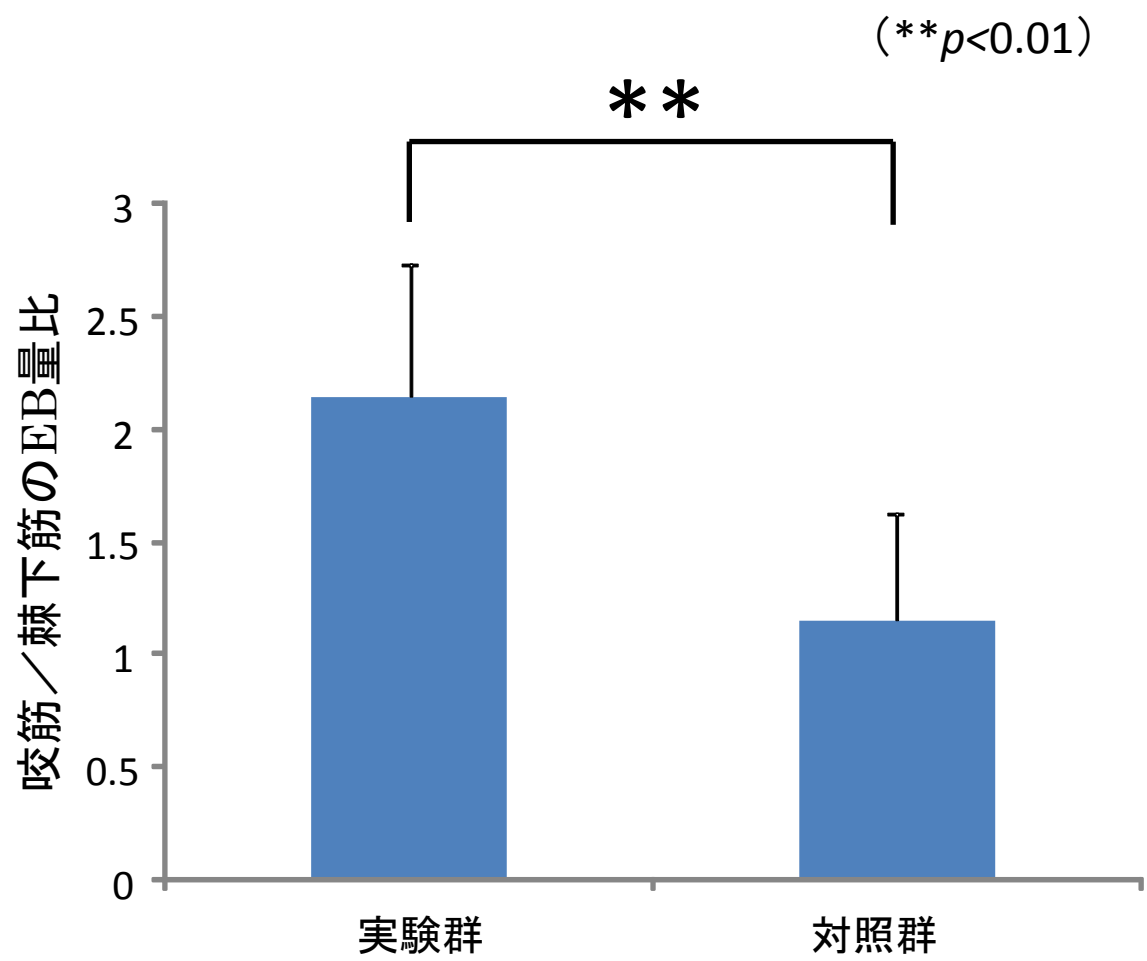


図 4 プラスチック板の減少量とエバンスブルー量との関係

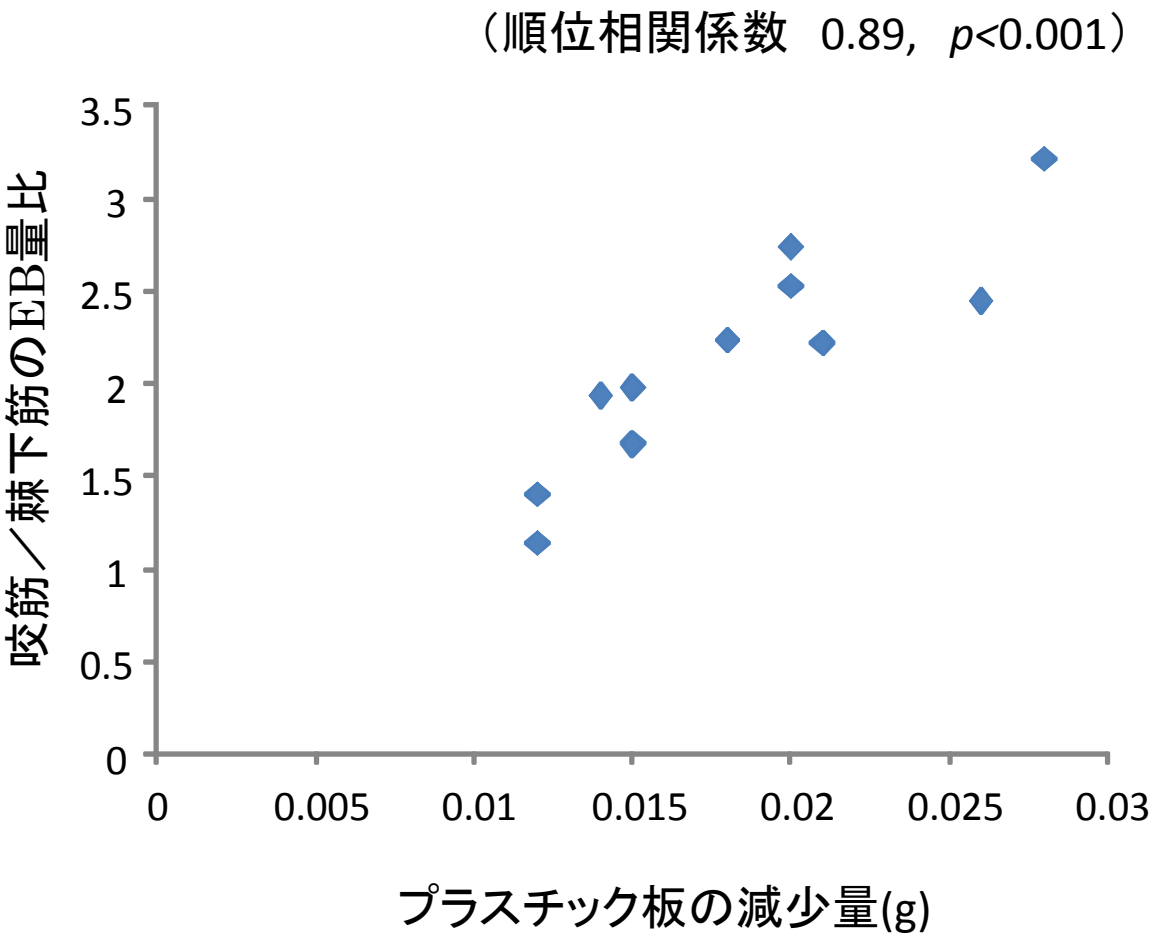


図5 浸潤麻酔がエバンスブルー量に与える影響

A: 実験群

B: 対照群

C: 麻酔側EB量／非麻酔側EB量

